

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

0 052 288
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 81109375.6

(22) Anmeldetag: 30.10.81

(51) Int. Cl.³:

A 23 J 3/00
A 61 K 37/12, A 61 L 15/01
A 61 L 2/18, A 61 L 2/06
A 61 F 1/00, C 07 G 7/00

(30) Priorität: 13.11.80 DE 3042860

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
26.05.82 Patentblatt 82/21

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: HEYL Chemisch-pharmazeutische Fabrik
GmbH & Co. KG
Goerzallee 253
D-1000 Berlin 37(DE)

(72) Erfinder: Walter, Peter, Prof. Dr.
Waldstrasse 48
D-8034 Unterpaffenhofen-Harthaus(DE)

(72) Erfinder: Walter, Michael
Leopoldstrasse 97
D-8000 München 40(DE)

(74) Vertreter: Kinzebach, Werner, Dr. Patentanwälte
Reitstötter J. Prof.Dr.Dr. Kinzebach W. Dr. & Partner
Bauerstrasse 22 Postfach 780
D-8000 München 43(DE)

(54) Kollagenpräparate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung in der Human- und Veterinärmedizin.

(57) Die Erfindung betrifft Kollagenpräparate aus Kollagen I für die Human- oder Tiermedizin, die dadurch erhältlich sind, daß man Säugetier Kollagen-I-Material unter Bewahrung seiner biologischen Textur proteolysiert, vernetzt, reduziert, gewünschtenfalls heiß behandelt, formt und/oder Stücke "verschweißt" und schließlich sterilisiert.

EP 0 052 288 A2

M/21 222

Die Erfindung betrifft Kollagenpräparate, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung in der Human- und Veterinärmedizin.

Die Häufigkeit und Bedeutung von Hautdefekten vor allem nach Verbrennungs- und anderen Unfallverletzungen sind bekannt. Zu ihrer Versorgung diente bisher neben der übrigen Wundbehandlung das autologe Hautpräparat. Seiner Verwendung sind jedoch von der Defektgröße her Grenzen gesetzt. Es hat deshalb nicht an Versuchen gefehlt Kollagene, die einen Hauptbestandteil von Lederhaut (Corium), Bindegewebe, Sehnen, Fascien und Bändern bilden, in der Medizin z.B. als temporären Hautersatz, für Gefäßprothesen usw. anzuwenden (vgl. z.B. Umschau 66, 1966, 230). Über bisherige Bemühungen, ein geeignetes Hautersatzmaterial zu entwickeln, gibt z.B. die Monographie "Experimental Skin Grafts and Transplantation Immunity" von D.L.Ballantyne und J.M.Converse, Springer-Verlag Berlin 1979 Auskunft. Für Blutgefäßprothesen werden seit einigen Jahren modifizierte Blutgefäße vom Rind (sogenannte "Bovine heterograft") verwendet (vgl. z.B. Rosenberg, Surg. Forum 7, 1956, 243). Solche Prothesen haben die Erwartungen jedoch noch nicht erfüllt, weil sich durch Übertritt von Stoffen aus dem durchströmenden Blut irreversible Wandveränderungen entwickeln. Sie werden daher heute kaum noch verwendet.

Über die Herstellung und den Einsatz von Kollagenpräparaten unter Erhalt ihrer biologischen Textur für andere medizinische Anwendungen ist nichts bekannt. Die bisherige Verwendung von Kollagenpräparaten in der Medizin beschränkt sich auf Kollagenschwamm bzw. Kollagenvlies. Die biologische Textur des Kollagens ist in diesen Fällen zerstört, was zur Veränderung seiner physikalischen aber auch einiger biologischer Eigenschaften führt (vgl. z.B. M. Chvapil, Collagen Sponge: Theory and Practice of Medical Applications, J.Biomed.Mater.Res., 11, 1977, 721 bis 741).

M/21 222

1

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, modifizierte Kollagenpräparate tierischen Ursprungs für die Human- und Tiermedizin bereitzustellen, die längere Zeit gelagert und sofort trans- oder implantiert werden können, bei denen die erwünschten biologischen Eigenschaften (z.B. Keimabwehr, Anregung der Grundsubstanzproduktion von Zellen, Granulationsförderung, Blutstillung, usw.) des natürlichen Ausgangsmaterials erhalten geblieben sind und deren Form und physikalische Eigenschaften dem jeweiligen Verwendungszweck angepaßt sind.

Gegenstand der Erfindung sind daher Kollagenpräparate aus Kollagen Typ I, die dadurch erhältlich sind, daß man Säugetier-Kollagen-I-Material unter Bewahrung seiner biologischen Textur proteolysiert, vernetzt, reduziert, gewünschtenfalls heiß behandelt, formt und/oder Stücke "verschweißt" und schließlich sterilisiert.

Als Säugetier-Kollagen-I-Material verwendet man Haut, Corium, Fascien, strangförmige Formationen aus Sehnen, röhrenförmige Formationen aus Blutgefäßen und schlauchförmigen Hohlorganen, sackförmige Formationen aus Herzbeuteln und interstizielle Mammagewebe.

25

Die vorstehend genannten Ausgangsmaterialien entnimmt man Säugetieren, vorzugsweise Wiederkäuern, insbesondere der Ziege, dem Rind und Rinderfeten.

Die Proteolyse wird in Gegenwart von Ficin und L-Cystein in einem wäßrigen Medium bei einem pH-Wert von 5,5-6,5 und einer Temperatur von 30 bis 50 °C durchgeführt; die Vernetzung wird mit einem oder mehreren aliphatischen Dialdehyden mit 2 bis 10, insbesondere 4 bis 7 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise mit 1 - 10 %-iger, wäßriger Glutardialdehydlösung durchgeführt;

M/21 222

- 3 -

1

die Reduktion erfolgt mit Alkaliborhydrid, insbesondere
5 Natriumborhydrid in wäßrigem Medium

und die Heißbehandlung wird mit wasserdampfgesättigter
Heißluft bei 80° bis 100 °C einige Minuten durchgeführt
und zur Formgebung und/oder "Verschweißung" von Präparate-
10 stücken wird das Präparat oder die mit den Rändern
dicht aneinanderliegenden Präparatestücke auf einen
die gewünschte Form aufweisenden inerten, festen Körper
mit glatter Oberfläche aufgezogen und dort wird die
Heißluftbehandlung fortgesetzt.

15

Wenn man von einem dicken Kollagenmaterial ausgeht, unter-
wirft man es zuerst einer ersten Proteolyse, bringt es
dann durch Spaltung in Faserrichtung in die gewünschte
Dicke, proteolysiert das so erhaltene Material erneut und
20 behandelt es wie oben beschrieben weiter.

Vorzugsweise wird nach der Proteolyse eine Behandlung
mit verdünnter wäßriger Natriumchlorit-Lösung zwischen-
geschaltet.

25

Das Wässern zwischen den einzelnen Verfahrensstufen er-
folgt mit fließendem Wasser und dauert in der Regel
jeweils 24 Stunden.

30 Vorzugsweise behandelt man das Säugetier-Kollagen-I-Material
8 bis 24 Stunden mit einer wäßrigen Lösung, die 10 g
Ficin/Liter und 1 g L-Cystein/Liter enthält bei einem pH-Wert
von 6 und einer Temperatur von 37 °C, behandelt dann
24 Stunden mit einer 1 %-igen wäßrigen Natriumchloritlösung,

35

M/21 222

1

wässert, behandelt 7 Tage mit einer 1 bis 10 %-igen wäßrigen Glutaraldehydlösung, wässert, behandelt 24 Stunden mit einer
5 wäßrigen Natriumborhydridlösung, wässert und sterilisiert anschließend, wobei das Wässern mit fließen = r dem Wasser erfolgt und jeweils 24 Stunden dauert.

Zwecks Gewinnung von Kollagenpräparaten bestehend aus
10 schlauchförmigen Hohlorganen mit einem bestimmten Durchmesser zieht man ein formentsprechendes Kollagenmaterial nach der Reduktion und einer ersten kurzen Heißbehandlung auf einen stabförmigen, festen Körper mit glatter Oberfläche und dem gewünschten Durchmesser auf und behandelt
15 mit wasserdampfgesättigter Heißluft von etwa 1,5 atü bei 80 ° bis 100 °C einige Minuten lang weiter.

Als stabförmigen Körper verwendet man dabei vorzugsweise einen silikonbeschichteten Glasstab.

20

Zwecks Gewinnung eines Kollagenpräparats in Form eines beutelförmigen Hohlorgans mit bestimmtem Durchmesser zieht man nach der Reduktionsbehandlung und einer ersten kurzen Heißbehandlung den Herzbeutel eines Rindes auf einen
25 silikonbeschichteten Glaskolben auf, setzt die Heißbehandlung fort, nimmt den geformten Beutel ab und sterilisiert in üblicher Weise.

Zwecks Gewinnung eines Kollagenpräparates in Form eines
30 watte- oder wollartigen Füllmaterials geht man von geraspeltem Coriummaterial oder interstiziellem Mammagewebe aus.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung der oben geschilderten Kollagen-I-Präparate,
35 das die vorbezeichneten, zur Charakterisierung der

1

Präparate aufgeführten, Verfahrensmaßnahmen beinhaltet.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung
der vorbezeichneten Präparate in der Human- und Tier-
Medizin, für die chirurgische Versorgung von defekten
Körperoberflächen, als Trans- oder Implantate zum
Ersatz von Haut, Bändern, Sehnen, Sehnenscheiden, Hohl-
10 organen, Blutgefäßen und der weiblichen Brust.

- Als Ausgangsmaterial für die erfindungsgemäßen Präparate
wird Kollagen-I-material, vorzugsweise von der Ziege, ins-
besondere vom Rind und Rinderfeten, verwendet, das aus
15 mindestens etwa 90 % Kollagen vom Typ I besteht, das
sind z.B. die Haut, das Corium, Sehnen, Bänder, Blut-
gefäße, der Herzbeutel und das interstizielle Mamma-
gewebe der genannten Säugetiere. Die Art des Ausgangs-
materials richtet sich dabei insbesondere nach dem beab-
20 sichtigten Verwendungszweck in der Human- oder Tier-
medizin:

- Zur Versorgung von Körperoberflächen-(Haut)-defekten (hetero-
loges Hauttransplantat, Wundpflaster, Tupfer), z.B. nach
25 Verbrennungen und anderen Unfallverletzungen, werden Häute in
ihrer biologischen Textur eingesetzt.

- Zur Förderung der Osteoneogenese nach Frakturen mit und ohne
Substanzverlust werden Fascien unterschiedlicher Stärke und
30 vor allem das Corium (Lederhaut) insbesondere von erwachsenen
Rindern, ohne Epidermisdecke, als solches oder auch in
dünne Schichten gespalten, verwendet.

- Für Bandersatzpräparate (heterologer Bandersatz bei Rupturen
35 von Gewebsbändern) werden strangförmige Formationen aus
Sehnen, wie z.B. Biëgesehenen von Rindern verwendet.

- 1 Zur Herstellung elastischer Schläuche für defekte schlauchförmige Hohlorgane (Blutgefäße, Gallengang, usw.) dienen vorzugsweise röhrenförmige Formationen aus schlauchförmigen Hohlorganen, wie aus Arterien gewonnene Kollagenschläuche, und zum Schlauch vernähte Fascien; während für den Sehnen-scheidenersatz praktisch alle Kollagenformationen, wie die oben genannten, verwendet werden können.
- 10 Zur Herstellung sackförmiger Gebilde, z.B. Ersatzpräparate für die weibliche Brust, geht man vom Herzbeutel des Rindes aus. Zur Gewinnung von watte- oder wollartigem Füllmaterial geht man von geraspelttem Material, insbesondere geraspelttem Coriummaterial, oder von interstiziellem Mammagewebe aus.
- 15 Dicke Kollagensysteme, wie z.B. strangförmige Formationen aus Sehnen, werden vorzugsweise vor dem eigentlichen Verfahren einer Proteolyse unterworfen und dann parallel zur Faserrichtung durch Längsspaltung in die gewünschte Dicke gebracht. So wird z.B. der etwa mittelfingerstarke und 30 bis 40 cm lange verwendbare Teil der Beugesehnen von Rindern vorzugsweise zunächst als Ganzes einer 24-stündigen Proteolyse unterworfen, dann parallel zur Faserrichtung durch Längsspaltung das gewünschte Bandkaliber (z.B. mit einer 25 Stärke von ca. 2,5 mm und darüber) gewonnen, woran sich eine nachfolgende 24-stündige Proteolyse anschließt. Ein Endes des Bandes wird danach vorzugsweise geknotet und dann den weiteren Verfahrensschritten unterworfen.
- 30 Werden behaarte Häute als Ausgangsmaterial verwendet, so erfolgt vor dem eigentlichen Verfahren eine Enthaarung, wobei man zweckmäßigerweise nach dem aus der Gerberei-Technik bekannten "Äschern" arbeitet. Vorzugsweise werden dazu die Häute in gelöschten Kalk eingelegt, dem pro kg 1 g Natrium- 35 sulfat zugesetzt wird. Nach einer Verweildauer von 6 bis 10 Tagen werden die Häute gewässert, anschließend für 3 Stunden in 1 %-ige Essigsäure eingelegt und dann nochmals 24 Stunden gewässert.

Zweckmäßigerweise sollte das Ausgangsmaterial unmittelbar nach der Tötung (Schlachtung) der Tiere gewonnen werden. Wenn sich daran nicht sofort das erfindungsgemäße Präparationsverfahren anschließt, so ist eine Konservierung der Kollagensysteme durch Einfrieren und Lagerung bei Tiefkühltemperaturen nahezu praktisch unbegrenzt möglich. Eine solche Konservierung ist auch noch nach einer Enthaarung möglich.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist für alle genannten Ausgangsmaterialien gleichermaßen gut geeignet. Es kann aber zweckmäßig sein, je nach der Art des eingesetzten Ausgangsmaterials in einer oder mehreren der Verfahrensstufen verschiedene Reaktionszeiten, Reaktionstemperaturen und/oder Konzentrationen einzuhalten.

Die Proteolyse wird insbesondere mit den in der Lederindustrie zur Weiche und Beize eingesetzten Proteasen und unter den dafür üblichen Bedingungen durchgeführt. Als besonders zweckmäßig hat sich dabei die Proteolyse in Gegenwart von Ficin und L-Cystein erwiesen, wobei man vorzugsweise in einer wäßrigen Lösung bei einem pH-Wert von ca. 5,5 bis ca. 6,5, und insbesondere 6, und bei 30 bis 50 °C, insbesondere etwa 37 °C arbeitet. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt dabei zweckmäßigerweise durch Zusatz von 1N Trinatriumcitratpuffer. Die Reaktionszeit beträgt, abhängig von der Dicke der Kollagensysteme, im allgemeinen 8 bis 24 Stunden.

Zur Vernetzung der Peptidstrukturen der Kollagen-I-Präparate verwendet man di- oder polyfunktionelle Aldehyde, wie

z.B. Alkandiale mit 2 bis 10 und insbesondere 4 bis 7 Kohlenstoffatomen, aber auch Formaldehyd (Dihydroxymethylen). Als besonders zweckmäßig hat sich dabei aufgrund seines hohen Penetrationsvermögens und dem hohen Diffusionsgrad Glutardialdehyd erwiesen. Die Modifizierung des Vernetzungsgrades des Kollagens und damit die Steifigkeit des Materials ist stark von der Konzentration des Vernetzungsmittels abhängig. Insbesondere die

Herstellung von Material für Hohlorgane (Blutgefäße usw.) erfordert ein besonders weiches, flexibles Material. Die Konzentration (Angaben beziehen sich auf Glutardialdehyd) liegen im allgemeinen zwischen 1 und 10 Gew.-%, wobei die bevorzugten Konzentrationen bei Häuten mit biologischer Textur, Fascien und Corium 3 bis 5 %, für strangförmige Formationen aus Sehnen 5 bis 10 %, für röhrenförmige Formationen aus schlauchförmigen Hohlorganen 1 bis 3 % und für die Herstellung eines heterologen Sehnenscheidenersatzes bei 5 bis 8 % liegt. Im allgemeinen wird das Material in eine wäßrige Lösung des Aldehyds eingebracht und darin mehrere Tage, zweckmäßigerweise ca. 7 Tage, bei Raumtemperatur belassen.

Die Reduktion wird vorzugsweise mit einem in der Lederindustrie verwendeten reduzierenden Bleichmittel unter den dafür üblichen Bedingungen durchgeführt, insbesondere aber mit einem Alkaliborhydrid, wie z.B. Natriumborhydrid. Durch diese Reduktion wird Unlöslichkeit des Kollagens in saurem und alkalischem Milieu erreicht und gleichzeitig die durch den Quervernetzungsprozeß eingetretene Starre des Materials weitgehend aufgehoben. Das Material wird geschmeidiger, behält aber seine Reißfestigkeit. Der damit außerdem verbundene zusätzliche Bleicheffekt ist, insbesondere für die Anwendung als Wundpflaster, sehr vorteilhaft. Die Reduktion mit Alkaliborhydrid erfolgt in wäßrigem Medium. Man kann dabei im allgemeinen soviel Natriumborhydrid anwenden, wie dies zur Erreichung einer gleichmäßig weiß gebleichten Oberfläche erforderlich ist; in der Regel arbeitet man mit 0,5 bis 1,5 g Natriumborhydrid/Liter Wasser. Zur Reduktion wird das Material in die wäßrige Natriumborhydridlösung eingebracht und darin mehrere Stunden, in der Regel 4 bis 24 Stunden, bei Raumtemperatur belassen.

Die Sterilisation kann nach einer der zur Sterilisation von chirurgischem Material verwendeten üblichen Methoden durchge-

M/21 222

1

führt werden; als besonders geeignet, insbesondere auch für
5 eine nachfolgende gebrauchsfähige Lagerung, hat sich eine
Sterilisation mit wäßrigem Alkohol in Gegenwart geringer
Mengen an Propylenoxid, wie z.B. Einlagern des Materials
in 50 %-iges wäßriges Äthanol, das 1 Gew.-% Propylenoxid
enthält, während ca. 10 Tagen erwiesen. Das auf diese Weise
10 sterilisierte Material wird anschließend in eine sterile,
gepufferte Kochsalzlösung (BSS) eingelegt, aus der man
den Rest der Sterilisationslösung abdampft (z.B. im
Thermostat während 3 bis 8 Stunden). In diesem Zustand
ist das Material lagerfähig und gebrauchsfertig. Zur
15 Vermeidung einer Ablagerung von Calciumsalzen soll die
Kochsalzlösung frei sein von Calciumionen. Wird im Hinblick
auf die spätere Anwendung eine Lagerung in einer sterilen
Vakuumverpackung, also in trockener Form, oder in einer
nativen Kollagenlösung bevorzugt, so kann sich an die
20 Sterilisation eine Lyophilisation (Gefriertrocknung) oder
auch eine Trocknung an der Luft anschließen. Insbesondere
bei Hautersatzpräparaten ist eine Aufbewahrung in einer
nativen Kollagenlösung zweckmäßig, weil sie ihrerseits
den Heilprozeß günstig beeinflußt.

25

Um zu verhindern, daß trotz Wässerung die Proteolyse durch
nicht vollständig entfernte Proteasereste in geringem
Umfang weitergeht, ist es sehr zweckmäßig, nach dem Ver-
fahrensschritt der Proteolyse eine Behandlung mit Natrium-
30 chlorit (NaClO_2) zwischenzuschalten, wodurch die Proteo-
lyse gestoppt wird. Vorzugsweise wird dazu eine verdünnte
wäßrige Natriumchloritlösung, z.B. eine 1 %-ige Lösung,
verwendet.

35

Das nach dem Verfahrensschritt der Reduktion erhaltene Kollagenmaterial kann vor der Sterilisation zur Verbesserung der Elastizität einer Hitzebehandlung in mit Wasserdampf gesättigter Luft unterworfen werden, wobei man in der Regel einige Minuten bei 80 bis maximal 100°C und einem Druck von 1,5 atü arbeitet. Die Hitzebehandlung kann in einem üblichen Dampfsterilisationsgefäß durchgeführt werden.

Zur Erzeugung glatter, geschlossener Oberflächen kann das Kollagenmaterial in einem zweiten Teil dieser Hitzebehandlung mit der Oberfläche eines gegen das Material inerten, glatten, festen Gegenstandes, wie z.B. Glas, in Kontakt gebracht werden, der auf ca. 80 bis maximal 100°C aufgeheizt ist. Gut geeignet sind dafür auch silikonbeschichtete Oberflächen. Diese Heißkontaktierung dauert in der Regel einige Minuten, z.B. 1 bis 15 Minuten.

Die Heißkontaktierung ist insbesondere für die Abdichtung der inneren Oberflächen von Hohlorganen, wie z.B. von Blutgefäßen, von großer Bedeutung, da auf diese Weise völlig dichte und glatte innere Oberflächen erzielt werden, im Unterschied zu den bisher verwendeten modifizierten Blutgefäßen ("Bovine heterograft") nach dem Stand der Technik.

Nach diesem Verfahren lassen sich Gefäße mit einem bestimmten Durchmesser relativ leicht dadurch herstellen, daß man das Kollagenmaterial (z.B. aus Arterien gewonnene Schläuche oder zum Schlauch vernähte Fascienpräparate) auf einen stabförmigen Träger, z.B. einen silikonbeschichteten Glasstab vorgegebener Stärke aufzieht und danach der Heißbehandlung unterwirft. Dabei schrumpft das Ausgangsmaterial auf dem Glasstab

und erhält auf seiner ganzen Länge gleichmäßig den vorgegebenen Durchmesser. Auf diese Weise können durch geeignete Wahl des Durchmessers des Trägermaterials die Durchmesser der Gefäße eingestellt werden. Es wird außerdem die Elastizität von Gummischläuchen bei absoluter Dichte erreicht.

Auf die gleiche Weise können auch Materialstücke ohne Vernähung oder andere mechanische Hilfsmittel durch Heißbehandlung völlig dicht verschweißt werden, wobei die Stoßstellen gewissermaßen miteinander verschmelzen. Dies ist insbesondere sehr wichtig bei der Verbindung von Gefäßstücken, da die natürlichen Quellen, nämlich die isolierten Gefäßstücke, nur eine begrenzte Länge haben und bisher längere Gefäßstücke nur durch Aneinandernähen von kürzeren Stücken erhältlich waren. Dieser Vernähungsprozeß kann durch den Verschweißungsprozeß ersetzt werden, was insbesondere den Vorteil hat, daß an den Verschweißungsstellen keine Undichtigkeiten auftreten.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Kollagenpräparate eignen sich hervorragend für die chirurgische Versorgung von defekten Körperoberflächen, von Frakturen, Rupturen, defekten Sehnenscheiden und defekten Hohlorganen. Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Kollagenpräparate.

Die erfindungsgemäß hergestellten Präparate werden vom Empfänger nicht nur toleriert, sondern integriert. Körperflächenabdeckungen werden kurzfristig integriert und nach erfolgter Granulation abgestoßen. Es hat sich gezeigt, daß der von Rindern und Ziegen erhaltene Kollagentyp für den Menschen unbedenklich ist, weil seine Aminosäuresequenz weitgehend derjenigen des menschlichen Kollagens entspricht.

1

B e i s p i e l 1

5

Das Fell eines Rindes oder einer Ziege wird - wie in der Gerberei üblich - enthaart, indem man es in gelöschten Kalk, der 1 g Natriumsulfit pro kg gelöschtem Kalk enthält, einlegt. Nach 6 bis 10 Tagen wird die Tierhaut gewässert, anschließend 3 Stunden in 1 %-ige Essigsäure eingelegt und dann nochmals 24 Stunden gewässert. Die erhaltene Haut ist enthaart.

10

15

20

25

30

35

Aus dieser Haut schneidet man ein Stück von 40 x 40 cm und legt dieses Hautstück in 3 Liter Proteolyselösung, die mit 1 N Trinatriumcitrat-Puffer auf pH 6 eingestellt worden ist. Die 3 Liter Proteolyselösung enthalten 30 g Ficin und 3 g L-Cystein. Man läßt die Proteolyselösung etwa 16 Stunden lang bei 37 °C auf das Hautstück einwirken. Anschließend wird 24 Stunden unter fließendem Wasser gewässert. Dann wird das Hautstück 24 Stunden in eine 1 %-ige Natriumchlorit-Lösung (NaClO_2) anschließend wieder 24 Stunden in fließendes Wasser gelegt. Danach legt man das Hautstück 7 Tage in eine wäßrige, 3 %-ige Glutardialdehydlösung, in der es von Zeit zu Zeit bewegt wird, legt anschließend wieder 24 Stunden in fließendes Wasser, überführt das Präparat dann in eine wäßrige, 1 %-ige Natriumborhydrid (NaBH_4) Lösung, wässert erneut 24 Stunden, sterilisiert 10 Tage lang bei Raumtemperatur in einer wäßrigen, 50 %-igen Äthylalkohollösung, die 1 % Propylenoxyd enthält, legt dann das Präparat in eine sterile, gepufferte Kochsalzlösung, heizt die Lösung in Thermostaten auf 60 bis 90 °C und verdampft 3 bis 8 Stunden lang den Rest der Sterilisationslösung. Das so erhaltene fertige Präparat kann man entweder in nativer Kollagenlösung aufbewahren oder lyophilisieren und in steriler Vakuumverpackung lagern.

1

B e i s p i e l 2

5

Acht Beugesehnen von Rindern (30 bis 40 cm lang, mit einem Durchmesser von 2 bis 2,5 cm) werden 24 Stunden bei pH 6 und 37 °C in 3 Liter der in Beispiel 1 beschriebenen Proteolyselösung liegengelassen. Dann spaltet man die Sehnen längs, parallel zum Faserverlauf in etwa 2 bis 3 mm starke Bänder und legt die erhaltenen Bänder nochmals 24 Stunden lang bei 37 °C und pH 6 in 3 Liter der in Beispiel 1 beschriebenen Proteolyselösung. Man wässert und behandelt mit Natriumchloritlösung, wie in Beispiel 1 beschrieben, und verwendet zur Vernetzung eine 4 %-ige, wäßrige Glutardialdehydlösung. Die Weiterbehandlung und Sterilisierung erfolgt wie in Beispiel 1.

20

B e i s p i e l 3

Rinderhaut wird, wie in Beispiel 1 beschrieben, enthaart. Dann entfernt man in an sich bekannter Weise die Epidermis, um das Corium zu gewinnen. Ein Stück Corium von etwa 40 x 40 cm wird eingefroren und anschließend durch Raspeln zerfasert. Das geraspelte Material wird in 3 Liter Proteolyselösung, wie in Beispiel 1 beschrieben, proteolysiert, auch die Weiterbehandlung erfolgt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Man erhält ein fasriges, wolliges Material.

30

B e i s p i e l 4

35

Aus dem Euter einer frisch geschlachteten Kuh werden 800 g interstizielles Mammagewebe isoliert, und gemäß den Angaben des Beispiels 1 proteolysiert und weiter-

M/21 222

-14-

1

behandelt. Man erhält, ähnlich wie in Beispiel 3, ein fasriges, wolleartiges Füllmaterial.

5

B e i s p i e l 5

8 bis 10 Körperarterienstücke von 30 bis 50 cm Länge
10 und 1 bis 2,5 cm Durchmesser, isoliert aus frisch geschlachteten Rindern, gibt man in 3 Liter Proteolyse-
lösung, wie in Beispiel 1 beschrieben und behandelt diese Präparate nach den Angaben des Beispiels 1.
Zur Vernetzung verwendet man allerdings eine 1 bis 2 %-ige
15 wäßrige Glutardialdehydlösung und läßt diese etwa 12
bis 16 Stunden lang einwirken. Die weiteren Schritte
bis einschließlich der Reduktion erfolgen nach den
Angaben des Beispiels 1. Danach unterwirft man die erhaltenen Arterienstücke in einem üblichen Dampfsterili-
20 sationsgefäß einer Heißbehandlung mit wasserdampfgesättigter Luft bei etwa 80 bis maximal 100 °C und einem Druck
von etwa 1,5 atü. Die Behandlungsdauer beträgt etwa
2 bis 8 Minuten. Man bereitet außerdem einen oder mehrere
Glasstäbe vor, die mit einem dünnen Silikonfilm über-
25 zogen sind und zieht die der Heißbehandlung entnommenen
Arterienstücke auf den oder die Glasstäbe auf. Man kann
mehrere Arterienstücke hintereinander auf einen Glasstab
aufziehen, so daß die Ränder der Arterienstücke dicht
aneinanderstoßen. Dann unterwirft man das Ganze nochmals
30 für 2 bis 10 Minuten der zuvor geschilderten Heißbehandlung
im Dampfsterilisator. Dabei "verschmelzen" die aneinander-
stoßenden Ränder der Arterienstücke und alle Arterien-
stücke nehmen den vom Glasstab vorgegebenen Innendurch-
messer an. Nach einigen Minuten entnimmt man das Präparat
35 dem Sterilisator und zieht den Glasstab aus dem Präparat
heraus. Man erhält auf diese Weise einen Kollagenschlauch
von gleichmäßigem Innendurchmesser und mit völlig glatter
und dichter Innenfläche. Die Sterilisierung und Aufbe-

1

5 wahrung kann in der in Beispiel 1 beschriebenen Weise
erfolgen.

B e i s p i e l 6

10 Den Herzbeutel einer frisch geschlachteten Ziege unter-
wirft man der in Beispiel 1 beschriebenen Proteolyse-
behandlung und den weiteren in Beispiel 1 beschriebenen
Verfahrensschritten bis einschließlich der sich an die
Reduktion anschließenden Wässerung. Für die Vernetzung
15 verwendet man allerdings eine 1 %-ige Glutardialdehyd-
lösung, die man etwa 12 bis 16 Stunden lang einwirken
läßt. Nach der Reduktion und Wässerung wird der Herz-
beutel in einem Dampfsterilisator bei 90 °C und etwa
1,5 atü etwa 5 Minuten der im vorhergehenden Beispiel
20 beschriebenen Heißbehandlung unterworfen. Dann wird
der der Heißbehandlung entnommene Herzbeutel auf die
Siliconfilm-beschichtete konvexe Seite der Glasschale
aufgezogen und für weitere 5 bis 10 Minuten in den
Dampfsterilisator zurückgegeben. Man entnimmt das
25 Präparat dem Sterilisator, läßt abkühlen, zieht das
Präparat von der Glasschale ab und sterilisiert, wie
in Beispiel 1 beschrieben.

30 Anwendungsbeispiele

 A) Ein gemäß Beispiel 4 hergestelltes, der weiblichen
 Brust nachgebildetes Kollagenpräparat, wird mit
 einem gemäß Beispiel 3 bzw. 4 hergestellten Füll-
35 material gefüllt und in der plastischen Chirurgie
 als Brustersatz verwendet.

1

Das gemäß den Beispielen 3 bzw. 4 hergestellte Füllmaterial kann in der plastischen Chirurgie auch zur Brustvergrößerung verwendet werden. Gegeüber den bisher für diese Zwecke verwendeten Silikonmaterialien hat es entscheidende Vorteile. Der erfindungsgemäße Füllstoff wandert nicht, sondern wird allmählich voll in das natürliche Brustgewebe integriert.

10

Aus einem gemäß Beispiel 2 hergestellten Coriumpräparat werden Wundpflaster, Tupfer und Tampons zugeschnitten. Nach dem Lyophilisieren werden sie steril und trocken verpackt. Sie können dann jederzeit als Pflaster, Tupfer und Tampons verwendet werden, die auch in der Wunde verbleiben können.

15

C) Ein gemäß Beispiel 1 hergestelltes Präparat wird am Operationstisch vor der Anwendung mit der Schere in die benötigte Form und Größe gebracht. Man legt das flächige Präparat auf die Wunde, näht es mit fortlaufender Naht fest, wobei exakt auf Stoß genäht wird. Die Fäden werden nach 14 Tagen gezogen. Die Abstoßung des Implantats beginnt mit einem Abheben der Ränder nach 18 bis 20 Tagen und ist nach etwa 3 bis 7 Wochen beendet.

20

25

D) Ein gemäß Beispiel 5 hergestelltes schlauchförmiges Präparat wird bei einer Sehnenruptur, vor dem Zusammennähen der Sehne über den Sehnenstumpf gestülpt und nach dem Vernähen der Sehne in die endgültige Position gebracht. Man kann das schlauchförmige Präparat auch vor der Applikation längs spalten, um die vernähte Sehne legen und anschließend mit evertierter Naht dicht vernähen. Man erhält auf diese Weise einen vorzüglichen Sehnenscheidenersatz, der in das Körpergewebe integriert wird.

30

35

1

5

Patentansprüche

1. Kollagenpräparate aus Kollagen I für die Human- oder
10 Tiermedizin, dadurch erhältlich, daß man Säugetier-
Kollagen-I-Material unter Bewahrung seiner biologischen
Textur proteolysiert, vernetzt, reduziert, gewünschten-
falls heiß behandelt, formt und/oder Stücke "verschweißt",
und schließlich sterilisiert.
- 15 2. Kollagenpräparate nach Anspruch 1, dadurch erhältlich,
daß man als Säugetier-Kollagen-I-Material Haut, Corium,
Fascien, Sehnen, Blutgefäße, schlauchförmige Hohl-
organe, Herzbeutel und interstizielle Mammagewebe
20 verwendet.
3. Kollagenpräparate nach Anspruch 1, dadurch erhältlich,
daß man Kollagen-I-Material von Ziege, Rind und Rinder-
25 feten verwendet.
4. Kollagenpräparate nach Anspruch 1, dadurch erhältlich,
daß man
30 die Proteolyse in Gegenwart von Ficin und L-Cystein
in einem wäßrigen Medium bei einem pH-Wert von 5,5-6,5 und
einer Temperatur von 30 bis 50 °C durchführt;
35 die Vernetzung mit einem oder mehreren aliphatischen
Dialdehyden mit 2 bis 10, insbesondere 4 bis 7 Kohlen-
stoffatomen, vorzugsweise mit 1 - 10 %-iger, wäßriger
Glutardialdehydlösung durchführt;

M/21 222

- 1 die Reduktion mit Alkaliborhydrid in wäßrigem Medium durchführt;
- 5 die Heißbehandlung mit wasserdampfgesättigter Heißluft bei 80° bis 100 °C einige Minuten durchführt und zur Formgebung und/oder "Verschweißung" von Präparatestücken, das Präparat oder die mit den Rändern dicht aneinanderliegen Präparatestücke auf einen die gewünschte Form aufweisenden inerten, festen Körper mit glatter Oberfläche aufzieht, dort die Heißbehandlung einige Minuten fortsetzt und dann sterilisiert.
- 10 5. Kollagenpräparate nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch erhältlich, daß man dickes Kollagenmaterial einer ersten Proteolyse unterwirft, dann durch Spaltung in Faserrichtung in die gewünschte Dicke bringt, das so erhaltene Material erneut proteolysiert und gemäß Anspruch 1 oder 4 weiterbehandelt.
- 20 6. Kollagenpräparate nach einem der Ansprüche 1, 4 oder 5, dadurch erhältlich, daß man nach der Proteolyse eine Behandlung mit verdünnter wäßriger Natriumchlorit-Lösung zwischenschaltet.
- 25 7. Kollagenpräparate nach einem der Ansprüche 1, 4, 5 oder 6, dadurch erhältlich, daß man zwischen den einzelnen Verfahrensstufen mit fließendem Wasser wässert.
- 30 8. Kollagenpräparate nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch erhältlich, daß man das Säugetier-Kollagen-I-Material 8 bis 24 Stunden mit einer wäßrigen Lösung, die 10 g Ficin/Liter und 1 g L-Cystein/Liter enthält, bei einem pH-Wert von 6 und einer Temperatur von etwa 37 °C behandelt, dann 24 Stunden mit einer 1 %-igen wäßrigen Natriumchloritlösung behandelt, wässert, 7 Tage mit einer 1 bis 10 %-igen wäßrigen Glutaraldehydlösung behandelt, wässert, 24 Stunden mit
- 35

1

5 einer wäßrigen Natriumborhydridlösung behandelt,
wässert und anschließend sterilisiert, wobei das
Wässern mit fließendem Wasser erfolgt und jeweils
24 Stunden dauert.

10 9. Kollagenpräparate nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch erhältlich, daß man zwecks Gewinnung schlauch-
förmiger Hohlorgane mit einem bestimmten Durchmesser
ein formentsprechendes Kollagenmaterial nach der
Reduktion und einer ersten kurzen Heißbehandlung
15 auf einen stabförmigen, festen Körper mit glatter
Oberfläche und dem gewünschten Durchmesser aufzieht,
mit wasserdampfgesättigter Heißluft von etwa 1,5 atü
bei 80 bis 100 °C einige Minuten behandelt und steri-
lisiert.

20 10. Kollagenpräparate nach Anspruch 9, dadurch erhältlich,
daß man als stabförmigen Körper einen silikonbe-
schichteten Glasstab verwendet.

25 11. Kollagenpräparate nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch erhältlich, daß man zwecks Gewinnung eines
beutelförmigen Hohlorgans mit bestimmtem Durchmesser
den Herzbeutel eines Rindes nach der Reduktionsbe-
handlung und einer ersten kurzen Heißbehandlung auf
einen silikonbeschichteten Glaskolben mit dem ge-
wünschten Durchmesser aufzieht, die Heißbehandlung
30 kurz fortsetzt, den geformten Beutel abnimmt und
sterilisiert.

35 12. Kollagenpräparate nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch erhältlich, daß man zwecks Gewinnung eines
watte- oder wollartigen Füllmaterials von geraspelttem
Coriummaterial oder interstiziellem Mammagewebe aus-
geht.

M/21 222

1

- 5 13. Kollagenpräparate nach Anspruch 1, 4, 5, 8, 9, 11
oder 12, dadurch erhältlich, daß man zum Zwecke
des Sterilisierens das fertige Kollagenpräparat
einige Tage lang in etwa 50 %-igem wäßrigen Äthyl-
alkohol, der etwa 1 % Propylenoxid enthält, ein-
legt, dann die Präparate in eine sterile, gepufferte
10 Kochsalzlösung überführt, die Kochsalzlösung er-
wärmt, so daß der Rest der Sterilisationslösung
im Verlaufe von mehreren Stunden verdampft.
- 15 14. Verwendung der Kollagenpräparate nach einem der
Ansprüche 1 bis 13 in der Human- und Tiermedizin
für die chirurgische Versorgung von defekten Körper-
teilen, als Trans- oder Implantate zum Ersatz von
Haut, Bändern, Sehnen, Sehnenscheiden, Hohlorganen,
Blutgefäßen und der weiblichen Brust.
- 20 15. Verfahren zur Herstellung der Kollagenpräparate nach
den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Säugetier-Kollagen-I-Material unter
Bewahrung seiner biologischen Textur proteolysiert,
25 vernetzt, reduziert, gewünschtenfalls heiß behandelt,
formt und/oder Stücke verschweißt und schließlich
sterilisiert.

30

35